1. OBJETIVO

Detectar la presencia de *Salmonella*, en muestras de alimentos mediante sistema molecular automatizado que utiliza la reacción de polimerasa en cadena (PCR). Utilizar como método de screening luego de la etapa de enriquecimiento.

2. CAMPO DE APLICACIÓN Y ALCANCE

De acuerdo con la validación AOAC aplicar este procedimiento a una variedad de alimentos entre ellos: salchichas, carne cruda picada, pollo crudo picado, queso mozzarella, pescado crudo congelado, jugo de naranja, leche al 2%, crema de leche, leche descremada, huevo líquido, pollo cocido, Hot dog, pimienta negra, platos preparados, chocolate, entre otros.

De acuerdo con la validación AFNOR aplicar este procedimiento a todos los alimentos de consumo humano y muestras ambientales.

3. FUNDAMENTO

El sistema de detección BAX es un método automatizado para detección de microorganismos en muestras ambientales y de alimentos. Fue el primer método de screening basado en PCR, combina la tecnología de PCR con la detección por fluorescencia.

El ADN de la muestra se combina con ADN polimerasa, nucleótidos y partidores específicos. Esta mezcla es sometida a una serie de ciclos de calentamiento y enfriamiento. Al calentar se desnatura el ADN por consiguiente la doble hebra de ADN se abre, luego al enfriar, los partidores que son fragmento de ADN específicos para *Salmonella,* reconocen la zona de enlace, luego la enzima usa los nucleótidos extendiendo la nuevas hebras de ADN y así sucesivamente hasta lograr en corto tiempo, crear millones de copia del ADN buscado, si es que este se encuentra presente en la muestra.

Cada vez que se produce la amplificación, el colorante fluorogénico incluido en la tableta de PCR se intercala en la doble hebra de ADN y emite una señal fluorescente. Luego en la fase de detección esta señal es medida. Durante la detección la temperatura es llevada al punto en donde las hebras de ADN se separan, liberando el colorante y bajando la señal. Este cambio en la fluorescencia es trazado contra la temperatura generando la curva de meeting, la cual es interpretada por el software del sistema BAX.

4. REFERENCIAS

4.1 AOAC 2005 Microbiological Methods. Chapter 17 p 186.

4.2 Manual de usuario DuPont Qualicon BAX System

4.3 Sitio web AOAC http://www.aoac.org/testkits/testedmethods.html

4.4 Sitio web AFNOR http://www.afnor-validation.com

5. TERMINOLOGÍA

5.1 PCR= Reacción en Cadena de la Polimerasa.

6. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

6.1 Materiales e Insumos

6.1.1 Gradilla de enfriamiento a 4ºC.

6.1.2 Guante de látex libres de polvo

6.1.3 Herramienta de trabajo para tubos de lisis (color azul).

6.1.4 Herramienta de trabajo para tubos de reacción (color gris).

6.1.5 Micropipeta calibrada de 1 a 10 µL calibrada.

6.1.6 Micropipeta calibrada de 20 a 200 µL calibrada.

6.1.7 Micropipeta calibrada de 8 canales de 5 a 50 µL calibrada.

6.1.8 Plumón permanente punta fina para marcar tubos

6.1.9 Puntas largas para micropipeta de 10 y 200 µL

6.1.10 Punta tipo jeringa para repetidor

6.1.11 Repetidor de volumen.

6.1.12 Tapas ópticas para tubos de PCR

6.1.13 Tijera de uso exclusivo para la técnica.

6.1.14 Tubos de lisis con tapas y rack

6.1.15 Tubos de PCR con tableta reactiva

6.1.16 Bolsas Stomacher

6.2 Medios de cultivo y reactivos

6.2.1 Agua peptonada tamponada.

6.2.2 Buffer de lisis

6.2.3 Caldo lactosado.

6.2.4 Caldo de preenriquecimiento universal.

6.2.5 Caldo cerebro corazón

6.2.6 Etanol al 70%

6.2.7 Proteasa

6.2.8 Solución de hipoclorito de sodio de uso doméstico al 1% en agua destilada

6.3 **Equipos**

6.3.1 Balanza de precisión con sensibilidad 0,1 g.

6.3.2 Computador en línea con el termociclador y de uso exclusivo

6.3.3 Cronómetro.

6.3.4 Impresora en línea con el termociclador y de uso exclusivo

6.3.5 Incubadora a 35 ± 1ºC

6.3.6 Incubadora a 37 ºC ± 1ºC

6.3.7 Placa calefactora regulada a 37 ± 1ºC, con su respectivo termómetro

6.3.8 Placa calefactora regulada a 95 ºC ± 1ºC, con su respectivo termómetro.

6.3.9 Regulador de voltaje

6.3.10 Stomacher 400.

6.3.11 Termociclador Applied Biosystem BAX System Q7.

6.3.12 Vortex.

7. DESARROLLO

7.1 ENRIQUECIMIENTO PRIMARIO

7.1.1 **Enriquecimiento para carnes de vacuno, carnes de pollo, queso natural y queso Mozzarella**

7.1.1.1 Pesar 25 g de la porción bolsa Stomacher o frasco estéril.

7.1.1.2 Homogenizar en juguera por 2 minutos con 225 mL de agua Peptonada Tamponada.

7.1.1.3 Incubar 20-24 h a 35ºC± 1ºC.

7.1.2 **Enriquecimiento para jugo de naranja**

7.1.2.1 Pesar 25 g de la porción en bolsa Stomacher.

7.1.2.2 Mezclar con 225 mL de Caldo de Pre-enriquecimiento Universal, agitar y luego reposar por 60 ± 5 minutos a temperatura ambiente.

7.1.2.3 No ajustar pH. Incubar por 24± 2 h a 35ºC ± 1ºC.

7.1.2.4 Realizar enriquecimientosecundario.

7.1.3 Enriquecimiento para pescado crudo o congelado

7.1.3.1 Pesar 25 g de la porción en bolsa Stomacher o frasco estéril.

7.1.3.2 Homogenizar en juguera por 2 minutos con 225 mL de Caldo Lactosado, dejar reposar por 60 ± 5 minutos a temperatura ambiente, de ser necesario ajustar a pH 6,8 ± 02.

7.1.3.3 Incubar por 24 ± 2 horas a 35ºC± 1ºC.

7.1.4 Enriquecimiento para huevo líquido

7.1.4.1 Pesar 25 g de la porción bolsa stomacher o frasco estéril.

7.1.4.2 Mezclar con 225 mL de agua Peptonada Tamponada.

7.1.4.3 Incubar 22-26 h a 35ºC± 1ºC.

7.1.4.4 Realizar enriquecimientosecundario

7.1.5 Enriquecimiento para leche chocolatada

7.1.5.1 Pesar 25 g de la porción bolsa stomacher o frasco estéril.

7.1.5.2 Mezclar con 225 mL de reconstituyente para leche no grasa. Dejar a temperatura ambiente por 60 ± 5 minutos.

7.1.5.3 Ajustar a pH 6,8 ± 02. Agregar 0,45 mL de solución de verde brillante.

7.1.5.4 Incubar 22-26 h a 35ºC± 1ºC.

7.1.5.5 Realizar enriquecimientosecundario

7.1.6 Enriquecimiento para leche descremada en polvo

7.1.6.1 Pesar 25 g de la porción bolsa stomacher o frasco estéril.

7.1.6.2 Mezclar con 225 mL de agua con de verde brillante (2 mL verde brillante 1% en 1 L de agua desionizada). Dejar a temperatura ambiente por 60 ± 5 minutos.

7.1.6.3 Sin agitar ni ajustar a pH, incubar 22-26 h a 35ºC± 1ºC.

7.1.6.4 Realizar enriquecimientosecundario

7.1.7 **Enriquecimiento para pimienta**

7.1.7.1 Pesar 25 g de la porción bolsa stomacher o frasco estéril.

7.1.7.2 Mezclar con 225 mL de Caldo Soya Tripticase. Dejar a temperatura ambiente por 60 ± 5 minutos**.**

7.1.7.3 Ajustar a pH 6,8 ± 02. Incubar 22-26 h a 35ºC± 1ºC.

7.1.7.4 Realizar enriquecimientosecundario

7.2 ENRIQUECIMIENTO PRIMARIO (VALIDACION AFNOR)

7.2.1 **Enriquecimiento para carne y pollo crudo**

7.2.1.1 Pesar asépticamente la muestra en bolsa stomacher y mezclar en proporción 1/10 en agua peptonada tamponada.

7.2.1.2 Incubar a 35 ºC± 1ºC por 16 a 20 horas.

7.2.2 **Enriquecimiento para productos lácteos excepto leche en polvo.**

7.2.2.1 Pesar asépticamente la muestra en bolsa stomacher y mezclar en proporción 1/10 en agua peptonada tamponada con novobiocina (20mg/L)

7.2.2.2 Incubar a 42 ºC ± 1ºC por 20 a 24 horas.

7.2.3 **Enriquecimiento para otros alimentos y muestras ambientales**

7.2.3.1 Pesar asépticamente la muestra en bolsa stomacher y mezclar en proporción 1/10 en agua peptonada tamponada.

7.2.3.2 Incubar a 37 ºC ± 1ºC por 16 a 20 horas.

7.2.4 **Enriquecimiento carne cruda incluida la carne con especias y carne congelada**

7.2.4.1 Pesar asépticamente la muestra en bolsa Stomacher y mezclar en proporción 1/10 con caldo de enriquecimiento MP.

7.2.4.2 Incubar a 42 ºC ± 1ºC por 24 horas

7.2.5 **Enriquecimiento ternera cruda incluida ternera con especias y ternera congelada**

7.2.5.1 Pesar asépticamente la muestra en bolsa Stomacher y mezclar en proporción 1/10 con caldo de enriquecimiento MP.

7.2.5.2 Incubar a 42 ºC ± 1ºC por 9 a 24 horas

7.3 ENRIQUECIMIENTO SECUNDARIO

7.3.1 Después de las 24 ± 2 horas de incubación, transferir 10 µL del cultivo a 500 µL de Caldo cerebro corazón para todos los alimentos, excepto carne, pollo, pescado alimentos marinos. Incubar a 37ºC ± 1ºC por tres horas,

7.4 **LISIS**

7.4.1 Encender las placas calefactoras y regularlas a 37 y 95ºC± 1ºC. Colocar las gradillas de enfriamiento en el refrigerador. Sanitizar superficies de trabajo, herramientas de trabajo, micropipetas y repetidor, utilizando papel absorbente humedecido con las soluciones de: primero, hipoclorito al 1%, segundo, alcohol 70% y tercero agua destilada. Determinar el número de muestras que se requiere analizar.

7.4.2 En un tubo estéril preparar el buffer de lisis de acuerdo al número de muestras que se va ha analizar mas un volumen para blanco, considerar que se requiere agregar 200 µL de la mezcla de lisis, por muestra.

7.4.3 Mantener la proporción recomendada por el fabricante. Ejemplo 12 mL de buffer de lisis más 150 µL de proteasa, 6 mL de buffer de lisis más 75 µL de proteasa o 3 mL de buffer de lisis más 37,5 µL de proteasa.

7.4.4 Mezclar suavemente en forma de 8 para evitar la producción de espuma**.**

7.4.5 Dosificar en volúmenes de 200 µL por tubo. Este puede ser almacenado en refrigeración hasta por 15 días.

7.4.6 Colocar las muestras en una gradilla ordenadas en hileras de 8.

7.4.7 Colocar los tubos de lisis conteniendo 200 µL de buffer de lisis en el mismo orden que las muestras.

7.4.8 Rotular el primer tubo de cada hilera para evitar confundir la posición.

7.4.9 Si los tubos fueron almacenados a 4 ºC, verificar que se encuentran vigentes para el uso.

7.4.10 Retirar las tapas con la herramienta azul, desplazar la herramienta sobre las tapas haciendo presión sobre ellas y palanquear de derecha a izquierda y viceversa.

7.4.11 Vortear el cultivo y agregar 5 µL de cultivo a cada tubo de lisis.

7.4.12 Colocar las tapas a los tubos de lisis, utilizando la herramienta azul, presionar la palanca metálica para retirar la herramienta sin retirar las tapas y luego presionar con el lomo de la herramienta.

7.4.13 Llevar los tubos a la placa calefactora regulada a 37ºC, durante 20 minutos para realizar la lisis.

7.4.14 Transcurridos los 20 minutos, trasladar los tubos a la placa calefactora regulada a 95ºC, durante 10 minutos.

7.4.15 Transcurridos los 10 minutos, trasladar los tubos a la gradilla de enfriamiento por 5 minutos. En esta etapa se puede detener el sistema y dejar en refrigeración hasta por 3 días o congelado a -20 ºC hasta por 20 días.

7.4.16 Dejar todo limpio y sanitizado utilizando las soluciones de hipoclorito de sodio al 1%, etanol 70% y agua destilada.

7.5 PCR

7.5.1 Una vez terminada la lisis encender el termociclador para precalentar. Una vez que al costado izquierdo del equipo se observa destacado con luz la palabra **POWER** hacer un clic sobre el icono termómetro. Abrir la bandeja presionando en la hendidura ubicada al costado derecho y verificar que no hay muestras en el rack.

7.5.2 Hacer clic sobre **next,** aparecerá la siguiente lectura:

Preparing for Rack load

Preparando para cargar el Rack

Please carefully follow instructions.

Por favor siga las instrucciones cuidadosamente

Preparing the cycler for loading.

Preparando para cargar

Do not load cycler yet.

No cargue aún.

7.5.3 Mientras espera que el equipo esté listo para cargar, colocar los tubos de reacción, en un rack de enfriamiento que contenga la plantilla metálica de color negro del termociclador.

7.5.4 Marcar el primer tubo de cada hilera de los tubos de reacción para no confundir la posición.

7.5.5 Con ayuda de la herramienta azul retirar las tapas de los tubos de lisis que se encuentran en el rack de enfriamiento.

7.5.6 Con ayuda de la herramienta gris, retirar cuidadosamente las tapas de los tubos de reacción y eliminarlas (movimientos bruscos pueden ocasionar la perdida de la tableta de PCR). Tomar la herramienta gris colocando el dedo pulgar hacia la parte más corta, deslizar la herramienta sobre las tapas y hacer palanca hacia la derecha. Eliminar las tapas.

7.5.7 Con pipeta multicanal introducir las puntas en los tubos de lisis que contienen el lisado, homogenizar y medir 50 µL.

7.5.8 Agregar el lisado sobre cada tubo de reacción en la posición correspondiente sin tocar la pastilla de reacción.

7.5.9 Colocar las tapas ópticas con la ayuda de la herramienta gris.

7.5.10 Llevar las muestras hasta el equipo. Cuando en pantalla aparece la siguiente lectura:

Cycler has reached load temperatures

El equipo ha alcanzado la temperatura de carga.

*Hacer clic sobre **"Next"** y parece la siguiente lectura:*

Ready for Rack load

Listo para cargar.

Please carefully follow instructions.

Por favor siga las instrucciones cuidadosamente.

Open the sample drawer and insert your samples. When the samples are in place, close the drawer and press "Next".

Abra la bandeja e inserte sus muestras. Cuando las muestras estén en el lugar cierre la bandeja y presione "Siguiente"

7.5.11 Abrir la bandeja del termociclador presionando en la hendidura ubicada en frente a mano derecha del equipo.

7.5.12 Introducir las muestras al termociclador con la plantilla metálica y ubicar en la posición correcta, es decir, la misma ingresada en el PC.

7.5.13 Cerrar la bandeja del termociclador, presionando desde el frente y hacer clic en **next**, para iniciar la reacción, esta tendrá una duración de 2 a 3 horas, aproximadamente.

7.5.14 Una vez terminado el proceso hacer clic sobre **finish** para terminar.

7.5.15 Imprimir la hoja de resultados y guardar en archivador rotulado "Registro de Lectura e Informe de Resultados Laboratorio de Enterobacterias (Nº 348)", ubicado en el laboratorio 348.

7.5.16 Retirar los tubos de reacción del termociclador y eliminarlos en solución de hipoclorito al 1%.

7.5.17 Apagar los equipos.

7.6 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

7.6.1 **En la plantilla de resultados se observa con signo menos (-) las muestras que** resultan negativas para *Salmonella* y con un signo más (+) las que resultan positivas para *Salmonella.* Un signo de interrogación indica que el resultado es indeterminado y este ocurre cuando el control positivo interno no alcanza el nivel necesario para ser considerado válido y la cantidad de target específico no alcanza a ser detectada. Un resultado indeterminado puede ser debido a los reactivos, fallas en el sistema o error de operación.

7.6.2 El sistema cuenta con un control positivo interno (INPC) por lo cual no requiere incorporar controles positivos o negativos adicionales, solo se incluye un blanco.

7.6.3 En los métodos moleculares el control positivo es un control interno de reacción el cual incluye un target especial y en el caso particular de BAX que es un sistema cerrado y patentado el control interno viene incluido en la pastilla de reacción liofilizada por lo tanto no se necesita un segundo control solo el blanco para evidenciar que los reactivos no han sido contaminados en la manipulación. El sistema está validado de esta forma.

7.6.4 Los resultados se registran en RG-712.00-072, como presuntivo positivo, negativo o indeterminado a la espera de los análisis de confirmativos.

7.7 CONFIRMACIÓN

7.7.1 Todos los resultados positivos deben ser confirmados aislando el patógeno desde la muestra presuntiva positiva según **Procedimiento Detección de Salmonella en Alimentos por método convencional, PRT-712.03-012.**

7.7.2 La especificidad descrita para el sistema BAX es 0.5% de Falsos Positivos y 0% Falsos negativos.

7.8 INTERPRETACION DE LA CURVA DE MELTING

7.8.1 La curva de melting muestra dos tipos de Peak; Peak objetivo (*Salmonella*) y Peak de control (INPC). A veces el peak de control de *Salmonella* aparece como un doble peak.

Peak objetivo:

Las reacciones positivas muestran tres peak a 85, 88 y 90ºC. La distancia entre el primer y tercer peak puede ser de aproximadamente 5ºC. Cuando los niveles de *Salmonella* en la muestra son muy altos los peak de 88 y 90 ºC se pueden combinar y se puede ver solamente dos Peak. Cuando este Peak combinado es muy alto es posible que el Peak correspondiente al control interno sea muy pequeño o desaparezca.

Peak de control

El peak de control se produce entre 78 a 80ºC, este puede variar en altura dependiendo de la presencia o ausencia del microorganismo objetivo (*Salmonella*). . En ausencia de *Salmonella* sólo se observa el peak de control.

7.9 MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

7.9.1 Se deben seguir las precauciones para organismos nivel de bioseguridad 2

7.9.2 El personal que manipule este debe leer y seguir las instrucciones de seguridad entregadas por los fabricantes de medios de cultivos, reactivos y microorganismos usados en el análisis.

8. REGISTROS

8.1 Registro de resultados análisis

9. ANEXOS

Anexo Nº 1. Diagrama de trabajo.

Anexo Nº 2. Preparación del computador

Anexo Nº 3. Preparación del repetidor de volumen.

ANEXO Nº 1
DIAGRAMA DE TRABAJO

ENRIQUECIMIENTO PRIMARIO
Dilución 1/10

↓

Eppendorf con 0,5 mL de Caldo Cerebro Corazón

ENRIQUECIMIENTO SECUNDARIO
10 µL en 0,5 mL de CCC en tubo Eppendorf. Incubación por 3 horas a 37ºC.

↓

12 mL de buffer de lisis más 150 µL de proteasa. Agregar 200 µL por tubo.

LISIS DE LA MUESTRA
5 µL en 200 µL de buffer de lisis. 20 minutos a 37ºC , 10 minutos a 95 ºC y 5 minutos a 4ºC en rack de enfriamiento

↓

Tubos de reacción con tableta

50 µL demuestra lisada en tubo de reacción

↓

Computador → **PCR** ← Termociclador

ANEXO Nº 2

PREPARACIÓN DEL COMPUTADOR

- Encender el computador anexo al equipo y hacer clic sobre el icono Launch Bax System.
- Ingresar la clave (.) de uso del personal autorizado para el uso del equipo.
- Crear un archivo para el análisis que se va realizar. Hacer clic en el icono File y luego Save as, en la barra File name ingresar el nombre que se dará al archivo y presionar save.
- Seleccionar con el mouse las celdas que serán utilizadas e ingresar información solicitada por el sistema, en **Target** la opción *Listeria monocytogenes*, en Kit Lot Number, ingresar el número del kit que se utilizará, en **descripción** ingresar información como por ejemplo el tipo de muestra, luego hacer clic sobre **Apply.**
- Hacer clic en el pocillo y luego clic en **Sample Id**, ingresar el número de muestra presionar **Enter** y así sucesivamente para ingresar el número de cada una de las muestras a analizar. Incluir una muestra blanco.
- Luego en **Sample Id**, ingresar pocillo por pocillo el número interno asociado a la muestra se va a procesar en esa posición. Se debe hacer clic sobre la barra **Enter** para que se almacene la información.

ANEXO Nº 3

PREPARACIÓN DEL REPETIDOR DE VOLUMEN

- Utilizar punta tipo jeringa de 500 µL. Observar la tabla que viene inscrita en el repetidor.
- De acuerdo al volumen requerido, en este caso 200 µL, seleccionar el canal (2).
- Subir la palanca para bajar el émbolo. En condiciones asépticas abrir la punta tipo jeringa**.** Introducir el tope del embolo en el diente, debe quedar bien ajustado, sino el émbolo no se desplazará.
- Introducir la jeringa en la solución de lisis. Bajar suavemente la palanca para subir el émbolo y aspirar la solución sin producir espuma.
- Descartar las dos primeras descargas en la solución de lisis y luego dosificar en los tubos de lisis que sean necesarios.
- Colocar asépticamente las tapas con la ayuda de la herramienta azul, presionar las tapas y presionar la palanca metálica con el dedo pulgar para retirar la herramienta sin retirar las tapas.
- Verificar el llenado, si hay tubos con menor volumen estos deben ser descartados.